



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

: **Confirmation No. 6245**

Takaaki MAEKAWA et al.

: **Attn: BOX MISSING PARTS**

Serial No. 10/054,905

: **Docket No. 2002-0085A**

Filed January 25, 2002

METHOD FOR CULTURING EDIBLE  
FUNGUS

THE COMMISSIONER IS AUTHORIZED  
TO CLERK AND OFFER BY IN THE  
FEE FOR THIS PAPER TO DEPOSIT  
ACCOUNT NO 25-0375.

**CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC 119**

Assistant Commissioner for Patents,  
Washington, DC 20231

Sir:

Applicants in the above-entitled application hereby claim the date of priority under the International Convention of Japanese Patent Application No. 2001-18505, filed January 26, 2001, as acknowledged in the Declaration of this application.

A certified copy of said Japanese Patent Application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

Takaaki MAEKAWA et al.

By Matthew Jacob  
Matthew Jacob  
Registration No. 25,154  
Attorney for Applicants

MJ/pjm  
Washington, D.C. 20006-1021  
Telephone (202) 721-8200  
Facsimile (202) 721-8250  
April 24, 2002

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application 2001年 1月26日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2001-018505  
[ ST.10/C ]: [ JP2001-018505 ]

出 願 人  
Applicant(s): 有限会社筑波バイオシステム

2002年 2月 8日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造

出証番号 出証特2002-3006097

【書類名】 特許願

【整理番号】 PMEK00-002

【提出日】 平成13年 1月26日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造殿

【国際特許分類】 C12N 1/00  
C12M 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県稲敷郡江戸崎町江戸崎乙 8 0 2 - 3 6

【氏名】 前川 孝昭

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 2 丁目 8 1 1 - 3

【氏名】 磯田 博子

【特許出願人】

【識別番号】 597048492

【氏名又は名称】 有限会社筑波バイオシステム

【代表者】 前川 愛

【代理人】

【識別番号】 100071825

【弁理士】

【氏名又は名称】 阿形 明

【選任した代理人】

【識別番号】 100095153

【弁理士】

【氏名又は名称】 水口 崇敏

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033547

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 食用菌の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 炭素源としてショ糖 3 ～ 1 6 g / リットル、麦芽糖 1 ～ 6 g / リットル、窒素源として酵母エキス 0. 3 ～ 1. 2 g / リットルを含む液体培地に、アガリクス菌糸体を接種し、酸素濃度 2 0 ～ 9 0 % の除菌空気を吹き込みながら培養することを特徴とする食用菌の製造方法。

【請求項 2】 黒砂糖を含むショ糖を用いる請求項 1 記載の食用菌の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、食用に供するための菌糸体を効率よく製造する方法である。

【 0 0 0 2 】

【従来技術】

マツタケ目 (Agaricales) に属するマツタケ (Tricholoma matsutake)、シイタケ (Lentinus edodes)、マッシュルーム (Agaricus campestris)、ホンシメジ (Lyophyllum aggregatum)、ハツタケ (Lactarius hatsudake)、エノキタケ (Flammulina velutipes)、ナメコ (Pholiota nameko) などの菌糸体が一般に食用として供され、またこれらの生産方法として菌糸液体培養方法があることはよく知られている。

【 0 0 0 3 】

この液体培養方法は、通常ショ糖 5 0 g / リットル、硝酸態窒素 1 0 g / リットル、リン酸ナトリウム 5 g / リットル、硫化マグネシウム 2. 5 g / リットル及び硫酸鉄 0. 2 g / リットルを含む処方培地中で、静置状態で行われているが、このような方法では生産性が低い上に菌糸の回収に手間がかかり、回収効率が悪く、大量生産方法としては利用できない。

しかも、この方法では硝酸塩のような、人体に悪影響を及ぼす成分を含むため、食用に供するには培地を除くことが必要である。

## 【0004】

そのほか、さとうきびの搾り粕を利用した固体培養法も知られているが、この方法で必要量の菌糸体を得るには2～3か月間という長期間を要する上に、菌糸体の分離に煩雑な処理を必要とするという欠点がある。しかも、この方法では、菌の汚染がしばしばみられ、菌糸体を食品として利用する場合、カビ毒等の発生を防止して安全性を確保することが困難である。このため、通常は固体培養方法を用い、菌糸体を生育させたのち、さらに温度管理により子実体を発生させ、通常これを市販品として供給しているが、子実体は一般に農薬や培地に含まれる有害金属の吸収ならびにその蓄積が大きくそのまま食品として使用するには、安全性の点で大きな問題が残る。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、マツタケ目に属するキノコ類、例えばマッシュルームを液体培地を用いて効率よく培養し、培地から分離した菌糸体及びその培養液をそのまま食用に供しうるように製造することを目的としてなされたものである。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、キノコ類の液体培養方法について種々研究を重ねた結果、先にショ糖又はその含有物質を炭素源として含む液体培地に、所要のキノコ菌を接種し、高濃度の酸素を含む除菌空気を吹き込みながら培養する方法を提案したが（PCT/JP00/02595号）、さらに研究を進めたところ、窒素源として、これまで用いていた硝酸塩の代りに酵母エキスをを用いれば、菌糸体の生産量が著しく増加した。さらに菌糸体を含む液体培地並びに菌糸体を液体培地から分離し、培地に含まれる菌糸体からの有効成分と菌糸体を別々にそのまま食用に供しうることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

## 【0007】

すなわち、本発明は、炭素源としてショ糖3～16g/リットル、麦芽糖1～

6 g / リットル、窒素源として酵母エキス 0.3 ~ 1.2 g / リットルを含む液体培地に、アガリクス菌糸体を接種し、酸素濃度 20 ~ 90 % の除菌空気を吹き込みながら培養することを特徴とする食用菌の製造方法を提供するものである。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】

本発明方法においては、炭素源としてショ糖及び麦芽糖を、窒素源として酵母エキスを含む液体培地を用いることが必要であるが、それ以外の栄養成分については、従来の液体培地と同じものを用いることができる。この際の酵母エキスは、リン分の補給も兼ねている。

すなわち、本発明方法において用いられる液体培地の例としては、液体培地 1 リットル当り、ショ糖 3 ~ 16 g、麦芽糖 1 ~ 6 g、酵母エキス 0.3 ~ 1.2 g、リン酸ナトリウム 0.4 ~ 0.7 g 及び硫化マグネシウム 0.25 ~ 0.35 g を水に溶解したものを挙げることができる。

【 0 0 0 9 】

また、上記のショ糖の一部を黒砂糖に置き換えると、液体培地に必要なミネラル分、例えばカリウムやカルシウムを黒砂糖に含まれているミネラル分で代替することができる。この黒砂糖の配合量としては、通常ショ糖の 10 ~ 70 質量 % の範囲内で選ばれる。

【 0 0 1 0 】

本発明方法においては、このような組成の液体培地に所定のアガリクス菌糸体を乾燥質量で 1 ~ 10 mg / リットルの濃度で接種したのち、温度を 20 ~ 30 °C に維持し、酸素濃度 20 ~ 90 %、好ましくは 60 ~ 80 % の除菌空気を送り込みながら 1 ~ 5 日間培養する。この間、最初は 10 ~ 50 rpm で緩速攪拌し、次いで回転数を 40 ~ 150 rpm に増速して攪拌するのが好ましい。このようにして、径 5 ~ 10 mm のアガリクス菌糸体の球状又は多角体状の集塊が得られる。

この場合、常圧下、又は溶存酸素 7 ~ 8 mg / リットルの条件で培養すると中心部が黒変した塊状体を生じるが、これは塊状体内部への酸素の拡散が不足して壊死を起こしたものである。

## 【0011】

無機栄養源が十分量存在すると、塊状体はさらに増大し、10～20mmの大きさに達するが、溶存酸素が少ないと中心部が黒色を呈する。そして、液体培地中の溶存酸素量を15～30mg／リットルまで上昇させると、その径が40mmまで達しても黒変は認められない。

## 【0012】

本発明方法においては、炭素源としてショ糖とともに、農産品副生物の中から選ばれた少なくとも1種の微細片を組み合わせて用いることもできる。この農産品副生物は粉碎して100メッシュ通過以下、好ましくは200メッシュ通過以下の細片状として用いる。この場合、この細片が菌糸の集塊を発達させる核となり、菌体の塊状化を促進させることができる。ここで農産品副生物とは、農作物の中から主要目的物を回収した後の副生物であって、サトウキビ、イネ、ムギ、コーンコブ、トウモロコシの茎葉部、農作物の加工残さ、例えばふすま、米ぬか、さとうきびの搾り粕などのほか、木粉も含まれる。

また、ショ糖として粗糖を用いると、その中の不純物が、菌糸体の親和力を強化して塊状体を安定化するので有利である。

## 【0013】

このショ糖と農産品副生物を併用する場合の液体培地の組成としては、液体培地1リットル当り、ショ糖3～16g、麦芽糖1～6g、乾燥した農産品副生物の粉碎物0.1～15g、酵母エキス0.3～1.2g、リン酸ナトリウム0.4g及び硫化マグネシウム0.25gが適当である。

この場合、農産品副生物として、さとうきび、その搾り粕又はふすまを使用すると、アガリクス菌糸体の塊状化と同時に非常に強い苦味及び臭気を有する泡が発生するが、これは他の農産品副生物を用いた場合はほとんど認められない現象である。

## 【0014】

本発明方法において得られる塊状体の大きさは培地の窒素濃度に左右され、窒素濃度が多くなると小さくなる。また、塊状体の発達速度は炭素源の種類によって大きく変化する。例えば、さとうきびやその搾り粕又はふすまが存在すると、



これらが菌糸体の初期成育に有効に作用し、塊状化が加速度的に進行するので、培養初期には、空気中の酸素濃度と攪拌速度を調整して溶存酸素量を適切に制御する必要がある。

#### 【0015】

本発明方法は、例えば図1に示すような装置を用いて行うことができる。

図1において、耐圧容器からなるリアクター本体1に、充填された液体培地2中へ空気圧縮機3から除菌フィルター4を通った空気が吹き込み管5を介して導入され、ここでアガリクス菌の培養が行われる。この間、空気圧縮機3の圧力を、例えば0.1～0.5MPaに高めて溶存酸素濃度を徐々に増加させ、内部の気体は排気用圧力制御機6により排気の圧力を制御して系外に排出する。この間、攪拌機7により緩速攪拌し、液体培地2の表面に沿った液体の流れと空気の吹き込み管5による上向流とが作用して球状又は多角体状の塊状体が形成される。

上記の吹き込み管5に送られる空気の一部は、必要に応じ分岐され、圧力制御機8を経て循環される。

このリアクターにおいて塊状体の実容積がリアクター体積の30～35%に達すると見掛けの体積は60～70%に相当するようになるので、塊状体の径をあまり大きくして実体積を低下させるのは得策ではない。

#### 【0016】

##### 【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【0017】

##### 実施例1

図1に示す構造を有する耐圧容器として有効容量3リットルのバイオリアクターを用い、粗糖4g/リットル、黒砂糖3g/リットル、麦芽糖4g/リットル、酵母エキス0.6g/リットル、リン酸ナトリウム0.4g/リットル及び硫化マグネシウム0.25g/リットルを含む液体培地を装入し、マッシュルーム・アガリクス・ブラゼイ・ムリル (*Mushroom Agaricus Blazei Murill*) 3mg (乾燥質量) を接種し、温度30℃において3日間培養することにより塊状菌糸体8.2g (乾燥質量) を得た。また、液体中

より  $\beta$  - 1, 6 D - グルカン 2 5 0 m g を回収することができた。

この際の空気圧力は 0. 1 2 M P a、空気流量 0. 0 5 リットル／分であった。

【 0 0 1 8 】

実施例 2

実施例 1 で用いた液体培地の代りに、粗糖 4 g／リットル、黒砂糖 3 g／リットル、粗製さとうきびの乾燥粉末（2 0 0 メッシュふるい目通過）0. 1 g／リットル、酵母エキス 1. 0 g／リットル、硫化マグネシウム 0. 2 5 g／リットルを含む液体培地 1 リットルを用い、実施例 1 と同様にしてマッシュルーム・アガリクス・プラゼイ・ムリル 3 m g（乾燥質量）を植菌後、培養した。3 日間培養したのちに菌糸体 1 1. 2 g（乾燥質量）と液体中に  $\beta$  - 1, 6 D - グルカン 3 5 0 m g を得た。

【 0 0 1 9 】

【発明の効果】

本発明によると、硝酸塩のような人体への有害物質を含まない液体培地を用いてアガリクス菌糸体を培養するので、得られる担子菌を液体中の有用成分とともに食用に供することができ、従来の方法に比べ 3 ～ 4 倍の有用成分の利用が可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明方法を行うのに好適なバイオリアクターの 1 例を示す断面略解図。

【符号の説明】

- 1 リアクター本体
- 2 液体培地
- 3 空気圧縮機
- 4 除菌フィルター
- 5 吹き込み管
- 6 排気用圧力制御機
- 7 攪拌機

8 圧力制御器



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マツタケ目に属するキノコ類、例えばマッシュルームを液体培地を用いて効率よく培養し、培地から分離した菌糸体及びその培養液をそのまま食用に供しうるように製造する。

【解決手段】 炭素源としてショ糖 3 ～ 1 6 g / リットル、麦芽糖 1 ～ 6 g / リットル、窒素源として酵母エキス 0 . 3 ～ 1 . 2 g / リットルを含む液体培地に、アガリクス菌糸体を接種し、酸素濃度 2 0 ～ 9 0 % の除菌空気を吹き込みながら培養する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597048492]

1. 変更年月日 2000年 6月20日

[変更理由] 住所変更

住 所 茨城県稲敷郡江戸崎町江戸崎乙802-36

氏 名 有限会社筑波バイオシステム